

TRANSFORMASI FRAGMEN DNA *SALMONELLA* KE DALAM SEL *E. COLI* DH5- α

E.S. Rahayu¹, A. Pertiwinigrum², R. Indrati¹, S. Raharjo¹, S. Rahayu³ dan S. Margino⁴

ABSTRACT

Genomic DNA from *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, cultured in a Luria broth for 24 hr at 37°C, was isolated from the cells using EDTA as a chelating agent and SDS as a detergent and lysing agent. The amount of genomic DNA was then digested with each of three restriction endonucleases, i.e., EcoRI, HindIII, and BamHI for 4 hr at 37°C. A plasmid (pUC19) was used as a vector. Prior to use, the pUC19 plasmid was split with one of the three restriction enzymes and dephosphorylated using a bacterial alkaline phosphatase. The genomic DNA was then ligated to the corresponding predigested plasmid using a ligase at 15°C over night. Transformation of the DNA recombinant into *E. coli* DH5- α was successfully carried out using a heat shock method as indicated by gel electrophoresis

PENDAHULUAN

Salmonella merupakan salah satu bakteri patogen yang banyak mengkontaminasi pangan dan bisa menimbulkan gangguan kesehatan konsumen serta kerugian dalam industri pangan. Pangan yang diolah atau dikelola dengan tepat jarang ditemukan kadar kontaminasi *Salmonella* 1 sel per 25 gram bahan (Andrew, 1985). Wibowo *et al.* (1994) melaporkan bahwa populasi *Salmonella* yang ditemukan pada daging sapi segar dan karkas ayam broiler adalah sekitar 1% dari total bakteri yang ada. Mengingat ukuran populasi *Salmonella* pada pangan yang terkontaminasi relatif kecil maka diperlukan cara deteksi yang memadai.

Dengan menggunakan prosedur deteksi *Salmonella* yang konvensional maka diperlukan waktu sekitar 4-7 hari, mulai dari pre-enrichment, enrichment pada media selektif, isolasi, karakterisasi biokimiawi dan konfirmasi serologi (FDA, 1984; 1984; Andrew, 1985). Oleh karena itu kini banyak dikembangkan prosedur alternatif untuk deteksi *Salmonella* seperti aglutinasi flagela (FDA, 1984), imunoanalisis menggunakan enzim (Swaminathan and Ayres, 1980; Mattingly and Gehle, 1984; Swaminathan *et al.*, 1985), antibodi monoklonal (Mattingly *et al.*, 1985), hibridasi DNA (Fitts, 1985; Emswiler-Rose *et al.*, 1987; Flowers *et al.*, 1987; Tsen *et al.*, 1989). Namun demikian yang perlu dipahami oleh pemakai adalah kelemahan dan keunggulan dari tiap metode yang akan digunakan.

Teknologi hibridasi DNA adalah salah satu cara untuk deteksi *Salmonella* berdasar target deretan nukleotida yang

kini banyak dikembangkan untuk deteksi bakteri patogen yang lain. Metode hibridasi DNA yang telah dikomersialkan antara lain adalah Gene-Trak yang berupa kit untuk deteksi *Salmonella* dengan menggunakan label radioaktif (³²P). Metode ini hanya memerlukan waktu pengujian 44-48 jam, namun penggunaan label radioaktif memerlukan fasilitas dan kedisiplinan pengelolaan dengan label non radioaktif. Biotin merupakan salah satu label non radioaktif yang ditempelkan pada nukleotida melalui "nick translation". Rahayu (1991) menggunakan fotobiotin untuk mendeteksi adanya hibridasi pada spesies *Aspergillus*. Saat ini juga telah tersedia "dioxigenin-labeled deoxyuridine-triphosphate" (DIG-dUTP) sebagai label non radioaktif pada hibridasi DNA.

Keseluruhan tujuan jangka panjang dari penelitian ini ialah penggunaan pelacak non radioaktif untuk deteksi *Salmonella* dengan teknik hibridasi. Adapun secara khusus tujuan dari penelitian tahap awal ini adalah melakukan transformasi fragmen DNA *S. typhimurium* dengan menggunakan plasmid pUC19 ke dalam sel *E. coli* DH5- α yang masih hidup. Tahapan transformasi dimulai dengan isolasi DNA dengan vektor yang berupa plasmid, transformasi DNA rekombinan ke dalam sel inang, dan diakhiri dengan verifikasi sel transforman yang membawa DNA rekombinan. Adapun seleksi transforman yang membawa DNA yang cocok sebagai prob akan dilanjutkan pada penelitian berikutnya.

BAHAN DAN METODA

Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ialah isolat *Salmonella* yang diperoleh dari koleksi kultur mikroba dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta; American Type Culture Collection (ATCC) dari Amerika Serikat; dan Japan Collection of Microorganism (JCM) serta Institute Fermentation of Osaka (IFO) dari Jepang. Dalam penelitian tahap ini yang dipilih untuk digunakan lebih lanjut adalah *S. typhimurium* ATCC 14028 karena spesies ini paling banyak ditemukan pada bahan makanan dan karakternya telah banyak dikenal.

Isolasi DNA Kromosom *S. typhimurium*

Biakan murni *Salmonella* dari agar miring diinokulasikan ke dalam 5 ml media cair Luria dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam. Selanjutnya inokulum tersebut diinokulasikan ke dalam 50 ml media cair Luria dan diinkubasikan lagi pada suhu 30°C selama 24 jam sambil

¹ Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian UGM

² Staf Pengajar Fakultas Peternakan UGM

³ BPTP Ungaran, Jawa Tengah

⁴ Staf Pengajar Fakultas Pertanian UGM

digoyang. Untuk mendapatkan DNA yang cukup diperlukan sebanyak 100 ml. Kultur bakteri (100 ml) dipusingkan pada 4000 g pada suhu 4°C selama 15 menit. Setelah supernatan dibuang, ke dalam endapan sel ditambahkan 5 ml saline-EDTA (0,15 NaCl dan 0,1 M EDTA) pH 8,0 dan 400 µl sodium dodecylsulphate (SDS) 20% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 800 µl KCl 2,5 M dan campuran kloroform : isoamil alkohol (CIAA) dengan perbandingan 24:1 sebanyak 5 ml, digojog dengan vortex 10 detik, didiamkan 2 menit, digojog dengan vortex lagi 10 detik dan dipusingkan pada 27.000 g selama 15 menit. Lapisan yang berada di bagian atas diambil secara hati-hati agar CIAA tidak terikut dan ditambah etanol dingin sebanyak dua kali volume untuk presipitasi DNA. Benang-benang DNA yang diperoleh diambil menggunakan batang gelas dan disuspensikan pada 2 ml larutan buffer TE (10 mM Tris-HCl dan 1 mM EDTA) dan disimpan pada suhu 4°C.

DNA yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan enzim Rnase. Larutan buffer TE (1 ml) yang berisi DNA yang akan dimurnikan ditambah 40 µl larutan mengandung Rnase dan diinkubasikan pada 37°C selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan CIAA sebanyak 2 kali volume larutan dan dipusingkan pada 27.000 g selama 15 menit. Supernatan diambil dan ditambah etanol dingin sebanyak 2 kali volume supernatan. Benang-benang DNA diambil menggunakan batang gelas dan dilarutkan dalam 200 µl buffer TE dan diuji kemurniannya menggunakan spektrofotometer. Kemurnian dari DNA yang diperoleh diuji dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Apabila perbandingan absorpsi pada 260 nm dan 280 nm berkisar 1,65 - 1,82 maka DNA sudah dikatakan murni, namun bila nilainya masih lebih besar dari 2 berarti masih terkontaminasi oleh RNA sehingga perlu dimurnikan kembali menggunakan Rnase.

Pemotongan DNA Menggunakan Enzim Restriksi

Sebagian DNA yang telah diisolasi selanjutnya masing-masing dipotong menggunakan tiga jenis enzim restriksi yaitu EcoRI, BamHI, dan HindIII dengan variasi konsentrasi 2 U/µg; 2,5 U/µg dan 3 U/µg pada suhu 37 °C selama 2, 3 dan 4 jam. Hasilnya dipisahkan menggunakan gel agarose 0,8 % dengan ditambah etidium bromida (EtBr) untuk visualisasi

Penggabungan Fragmen DNA dengan Plasmid

Plasmid pUC19 yang akan digunakan masing-masing terlebih dahulu dipotong dengan enzim restriksi EcoRI, BamHI, dan HindIII dengan variasi konsentrasi 0,5 U/µg dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2, 3, dan 4 jam. Sebelum digabungkan, plasmid yang telah dipotong oleh enzim restriksi terlebih dahulu didefosforilasi dengan Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP). Potongan plasmid

(50 µl) ditambah BAP (1 µl) diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam. Selanjutnya diekstraksi menggunakan campuran phenol CIAA dengan volume yang sama dan dipusingkan 13.000 rpm selama 10 menit. Kemudian ditambahkan etanol dingin sebanyak 2 kali volume dan natrium asetat 3 M sebanyak 0,1 kali volume campuran plasmid, diendapkan dalam freezer selama semalam. Setelah itu dipusingkan pada 27.000 g selama 10 menit, dicuci dengan 300 µl etanol 70 % dan dipusingkan lagi 27.000 g selama 5 menit. Terakhir dikeringanginkan dan disuspensikan dalam 50 µl TE. Potongan plasmid pUC19 yang telah didefosforilasikan sebanyak 15 µl selanjutnya diligasi dengan fragmen DNA yang sudah didigesti dengan enzim restriksi yang sama dengan menggunakan 2 µl enzim ligase, diinkubasikan pada suhu 15°C selama semalam.

Transformasi ke Sel *E.coli* DH5-α

Inokulum *E.coli* DH5-α diinokulasikan ke dalam 5 ml media cair Luria dan diinkubasikan hingga diperoleh absorbansi 0,5 - 0,6, didinginkan dalam es selama 20 menit dan dipusingkan pada suhu 4°C selama 10 menit. Endapan sel yang diperoleh disuspensikan ke dalam 2 ml CaCl₂ 0,1 M dingin dan didinginkan ke dalam es selama 30 menit. Plasmid yang telah digabungkan dengan fragmen DNA (disebut plasmid rekombinan) ditransformasikan ke dalam sel *E.coli* DH5-α yang kompeten. Sel kompeten sebanyak 100 µl ditambah 10 µl rekombinan DNA, didinginkan dengan es selama 30 menit, selanjutnya dipanaskan pada suhu 42°C selama 2 menit. Berikutnya diikuti penambahan 900 µl media Luria, diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit, dipusingkan pada 27.000 g selama 1 menit. Supernatan sebanyak 850 µl dibuang, sedangkan sisanya ditambah 25 µl IPTG (isopropilthio-beta-D-galaktosidase) dan 25 µl X-Gal (5-bromo-4-kloro-indolil-beta-D-galaktosida), diinokulasikan ke dalam media agar Luria yang telah ditambah ampisilin dengan cara streak plate ataupun pour plate. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni berwarna putih yang tumbuh pada media agar Luria yang selanjutnya disebut sebagai klon.

Seleksi dan Determinasi Klon Positif

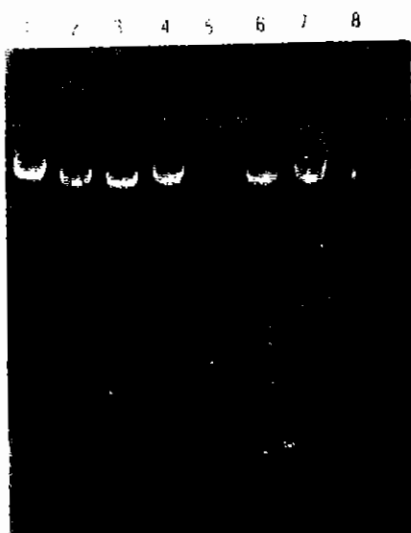
Seleksi klon yang membawa plasmid rekombinan dilakukan dengan pemetaan menggunakan enzim restriksi. Plasmid yang terdapat dalam masing-masing klon atau transforman diisolasi dan dipotong dengan enzim restriksi EcoRI, BamHI dan HindIII. Selanjutnya dilakukan pemisahan oleh gel agarose dan selanjutnya dipetakan fragmen-fragmen yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA *Salmonella*

Metoda yang digunakan untuk isolasi DNA *Salmonella* menggunakan EDTA dan SDS sudah lazim digunakan untuk bakteri Gram negatif. Adapun banyaknya

DNA yang bisa diperoleh dari 100 ml kultur *Salmonella* berumur 24 jam pada media cair Luria adalah 0,54 mg. Hasil elektroforesis DNA Genom dari beberapa isolat *Salmonella* pada gel agarose (0,8 %) disajikan pada Gambar 1. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA masih kurang baik. Kenampakan pita DNA yang memiliki semacam 'ekor' menunjukkan bahwa isolat DNA tersebut masih terkontaminasi oleh RNA, sehingga perlu dilakukan hidrolisis kembali menggunakan enzim RNase. Selain itu protein yang masih tersisa bisa mengkontaminasi isolat DNA, untuk itu perlu diperlakukan dengan enzim protease. Selanjutnya sisa degradasi protease diekstrak kembali dengan solven dan pengambilan DNA dikerjakan dengan presipitasi menggunakan etanol.



- | | |
|--|------------|
| 1. <i>Salmonella typhimurium</i> | ATCC 14028 |
| 2. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 1651 |
| 3. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 1652 |
| 4. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 6977 |
| 5. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 6978 |
| 6. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 6979 |
| 7. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 6980 |
| 8. <i>S. Choleraesuis</i> Subsp. <i>Choleraesuis</i> | JCM 6981 |

Gambar 1. DNA genom dari berbagai isolat *Salmonella*

Pada penelitian ini isolat DNA yang masih terkontaminasi dengan RNA diperlakukan dengan enzim RNase dua sampai tiga kali hingga diperoleh DNA yang betul-betul murni. Contoh hasil elektroforesis isolat DNA yang murni terlihat pada Gambar 2, lajur 1.

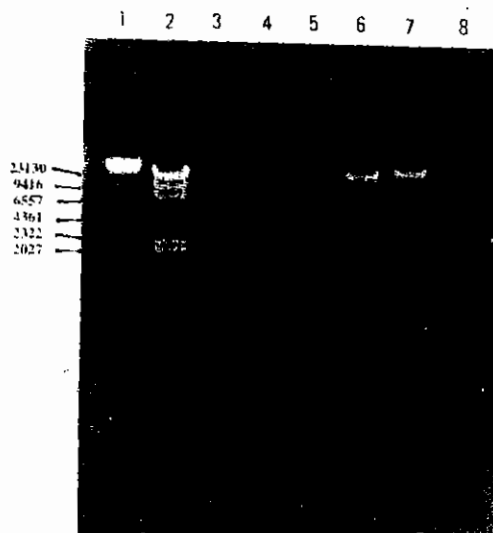
Pemotongan DNA Genom *Salmonella*

Pada penelitian ini plasmid yang digunakan sebagai vektor adalah pUC19 berukuran 2686 pasangan basa yang memiliki sisi tunggal untuk enzim restriksi yaitu EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, XmaI, BamHI, XbaI, SalI, AccI, HindII, PstI, SphI, dan HindIII. Pada penelitian ini dipilih tiga jenis

enzim restriksi yaitu EcoRI, BamHI, dan HindIII. Pemilihan ketiga jenis enzim ini didasarkan pada hasil penelitian Tsen *et al.* (1989) menggunakan ketiga enzim tersebut untuk mendapatkan fragmen DNA *Salmonella* 1800 pasangan basa.

Dalam penelitian ini konsentrasi masing-masing enzim restriksi yang digunakan tidak sama, penentuannya hanya didasarkan pada konsentrasi enzim terkecil yang dapat memberikan hasil pemotongan yang baik. Pada awal penelitian 6 isolat genom DNA dipotong dengan HindIII, selama 4 jam, namun dari hasil degradasinya ternyata sangat sulit diperoleh fragmen yang terpisah satu dengan yang lain. Oleh karena itu untuk selanjutnya dipilih hanya satu isolat yang akan disusun pustaka genomnya yaitu *S. typhimurium* ATCC 14028.

Hasil pemotongan DNA dengan waktu inkubasi 2 jam, oleh enzim EcoRI, BamHI, dan HindIII masih belum sempurna, karena pita masih banyak terakumulasi di bagian atas yang menunjukkan pemotongan belum tuntas. Demikian pula terlihat pada hasil pemotongan dengan inkubasi selama 3 jam terlihat masih belum baik. Gambar 2 (lajur 3, 4, 6 dan 7) adalah contoh hasil pemotongan yang sudah baik, karena potongan DNA telah terlihat sampai ke bawah sejajar dengan pita DNA pembanding (Gambar 2 lajur 2).

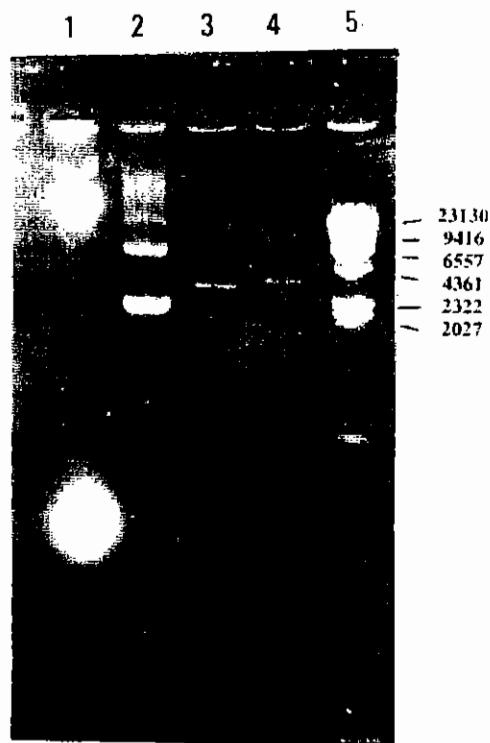


1. DNA genom sebelum dipotong
2. Lambda DNA/HindIII
3. DNA genom/EcoRI
4. DNA genom/BamHI
5. -
6. DNA genom/HindIII
7. DNA genom/HindIII
8. pUC19/EcoRI

Gambar 2. Hasil pemotongan DNA genom *S. typhimurium* ATCC 14028 dan plasmid pUC19 menggunakan enzim restriksi selama 4 jam pada suhu 37°C

Pemotongan Plasmid, Defosforilasi dan Penggabungan

Pemotongan plasmid oleh enzim restriksi selama 2 jam belum memberikan hasil yang memuaskan karena masih nampak 2 pita yang menunjukkan DNA plasmid belum terpotong sempurna. Hasil yang kurang memuaskan juga diperoleh meskipun sudah diinkubasikan selama 3 jam. Setelah diinkubasikan selama 4 jam maka baru bisa diperoleh hasil pemotongan yang baik, ditunjukkan dengan munculnya satu pita saja. Hasil elektroforesis dari plasmid pUC19 yang didigesti dengan enzim restriksi selama 4 jam disajikan pada Gambar 2 (lajur 8 : EcoRI) dan Gambar 3 (lajur 3 : BamHI dan lajur 4 : HindIII), sedangkan plasmid yang masih utuh belum terpotong berada pada Gambar 3 lajur 2.



1. DNA genom sebelum dideglesi
2. pUC19 sebelum didigesti
3. pUC19/BAMHI
4. pUC19/HindIII
5. Lamda DNA/HindIII

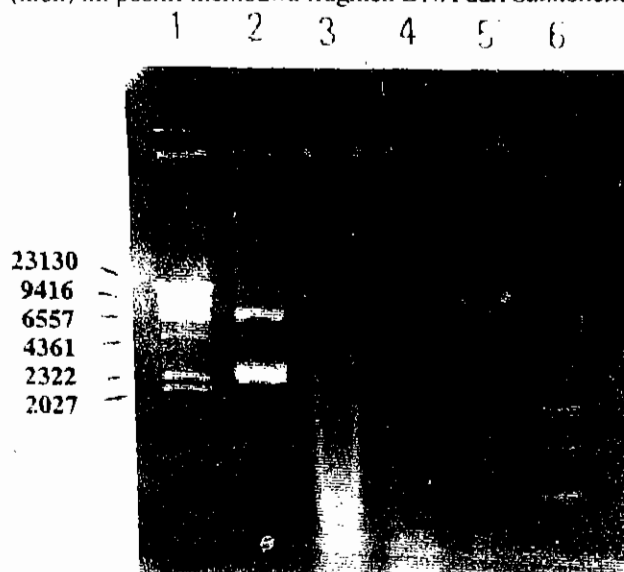
Gambar 3. Hasil pemotongan plasmid pUC19 menggunakan enzim restriksi selama 4 jam pada suhu 37°C

Dari penelitian ini diperoleh konsentrasi masing-masing enzim yang diperlukan untuk memotong setiap 1 µg plasmid pUC19 adalah 1 U untuk EcoRI, 1 U untuk BamHI, dan 1,5 U untuk HindIII. Plasmid yang telah terpotong dengan tuntas selanjutnya didefosforilasi menggunakan BAP dengan konsentrasi 0,1 U/µg plasmid selama satu jam pada suhu 37°C. Plasmid yang telah

didefosforilasi selanjutnya digabungkan dengan fragmen DNA genom dan diinkubasi pada suhu 15°C selama semalam.

Transformasi

Metoda transformasi yang digunakan adalah 'heat shock transformation'. Pelet sel *E.coli* yang kompeten diinkubasikan dalam CaCl_2 pada suhu dingin kemudian ditambahkan ke dalamnya plasmid rekombinan dan dilakukan kejutan panas pada suhu 42°C selama 2 menit untuk memudahkan pengambilan plasmid rekombinan oleh sel inang. Dari 6 kali transformasi yang telah dilakukan telah dikoleksi 42 transforman yang membawa plasmid rekombinan. Konfirmasi terhadap keberhasilan transformasi dilakukan dengan cara isolasi plasmid rekombinan dan kemudian didigesti dengan enzim restriksi yang sama dengan yang digunakan semula. Hasil konfirmasi disajikan pada Gambar 4 lajur 6 yang menunjukkan bahwa plasmid rekombinan yang diisolasi dari transforman TH-11 setelah dipotong dengan HindIII menghasilkan beberapa fragmen DNA genom yang berasal dari *Salmonella*. Hal ini membuktikan bahwa transforman (klon) ini positif membawa fragmen DNA dari *Salmonella*.



1. Lamda DNA/HindIII
2. pUC19
3. Plasmid rekombinan/EcoRI
4. Plasmid rekombinan/BamHI
5. Plasmid rekombinan/BamHI
6. Plasmid rekombinan/HindIII

Gambar 4. Hasil pemotongan plasmid rekombinan yang diisolasi dari transforman

Proses transformasi ini terus dilakukan hingga diperoleh koleksi genom *Salmonella* yang lebih banyak. Untuk verifikasi lebih lanjut tentang adanya transforman atau klon yang positif pembawa gena *Salmonella* dilakukan pemetaan dengan enzim restriksi. Klon-klon yang positif

pembawa fragmen DNA *Salmonella* akan digunakan untuk seleksi lebih lanjut untuk dijadikan pelacak.

Kesimpulan

Dari sejumlah transforman yang sudah dikoleksi ternyata bisa diperoleh klon yang positif. Oleh karena itu tujuan untuk melakukan transformasi fragmen DNA *Salmonella* ke dalam sel *E. coli* DH5- α sudah bisa dikatakan berhasil. Selanjutnya akan dilakukan pemilihan fragmen DNA yang spesifik *Salmonella* yang nantinya akan digunakan untuk membuat pelacak non radiaktif.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrew, W.H. 1985. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* 39(3):77-82.
- Doyle, M.O. and Cliver, D.O. 1990. *Salmonella*. In "Foodborne Diseases", D.O. Cliver (Ed). Academic Press, Inc. New York.
- Emswiler-Rose, B., Bennet, B., and Okrend, A. 1987. Comparison of cultural methods and the DNA hybridization test for detection of *Salmonella* in ground beef. *J. Food Sci.* 52(6):1726-1727.
- FDA. 1984. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. Food and Drug Administration, Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.
- Fitts, R. 1985. Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* 39(3):95-102.
- Flowers, R.S. 1985. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. *Food Technol.* 39(3):103-107.
- Flowers, R.S., Mozola, M.A., Curiale, M.S., Gabis, D.A., and Silliker, J.H. 1987. Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Sci.* 52(3): 781-785.
- Mattingly, J.A. and Gehle, W.D. 1984. An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 49:807-809.
- Mattingly, J.A., Robinson, B.J., Boehm, A., and Gehle, W.D. 1985. Use of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* 39(3):90-94.
- Rahayu, E.S. 1991. Chemotaxonomic studies of osmophilic species of *Aspergillus*. Doctor thesis. Dept. of Agric. Chemistry, The University of Tokyo, Japan.
- Swaminathan, B. and Ayres, J.C. 1980. A direct immunoenzyme method for the detection of *Salmonellae* in foods. *J. Food Sci.* 45:352-355.
- Swaminathan, B., Aleixo, J.A.G., and Minnich, S.A. 1985. Enzyme immunoassays for *Salmonella*: One-day testing is now reality. *Food technol.* 39(3):83-88.
- Tsen, H., Chen, M., Shieh, J., Wang, S., and Hu, N. 1989. Possible use of a 1.8 kb DNA fragment for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J. Ferment. Bioeng.* 68(1):1-6.
- Wibowo, D., Kasmidjo, R., Sardjono, dan Rahayu, E.S. 1994. Tingkat cemaran *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* dan *E.Coli* pada makanan dan minuman. Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta

